

Comment créer une plante transgénique ?

Dr. Pierre Jean SILVIE

A partir du matériel didactique de
Dr. Catherine Pannetier, CIRAD,
Versailles, France

Les étapes d'un programme de transgénèse

- **Identification du gène d'intérêt**
- **Utilisation d'une méthode de transformation efficace selon la plante ciblée**
- **Sélection d'un grand nombre de lignées transformées**
- **Caractérisation de ces lignées**
 - **présence du gène (PCR)**
 - **nombre de copies (hybridation Southern)**
 - **niveau d'expression - ARN (northern, RT-PCR)**
 - **présence de la protéine (analyses biochimiques - western)**
 - **physiologie: impact potentiel sur le phénotype**
- **Identification de la lignée d'intérêt: une copie, fort niveau d'expression, pas de phénotype indésirable.**
- **Essais au champ**

Un laboratoire pour culture de tissus !



(Source: INRA, Versailles)

Espace et matériels



(Source: INRA, Versailles)

Ressources humaines qualifiées !



(Source: INRA, Versailles)

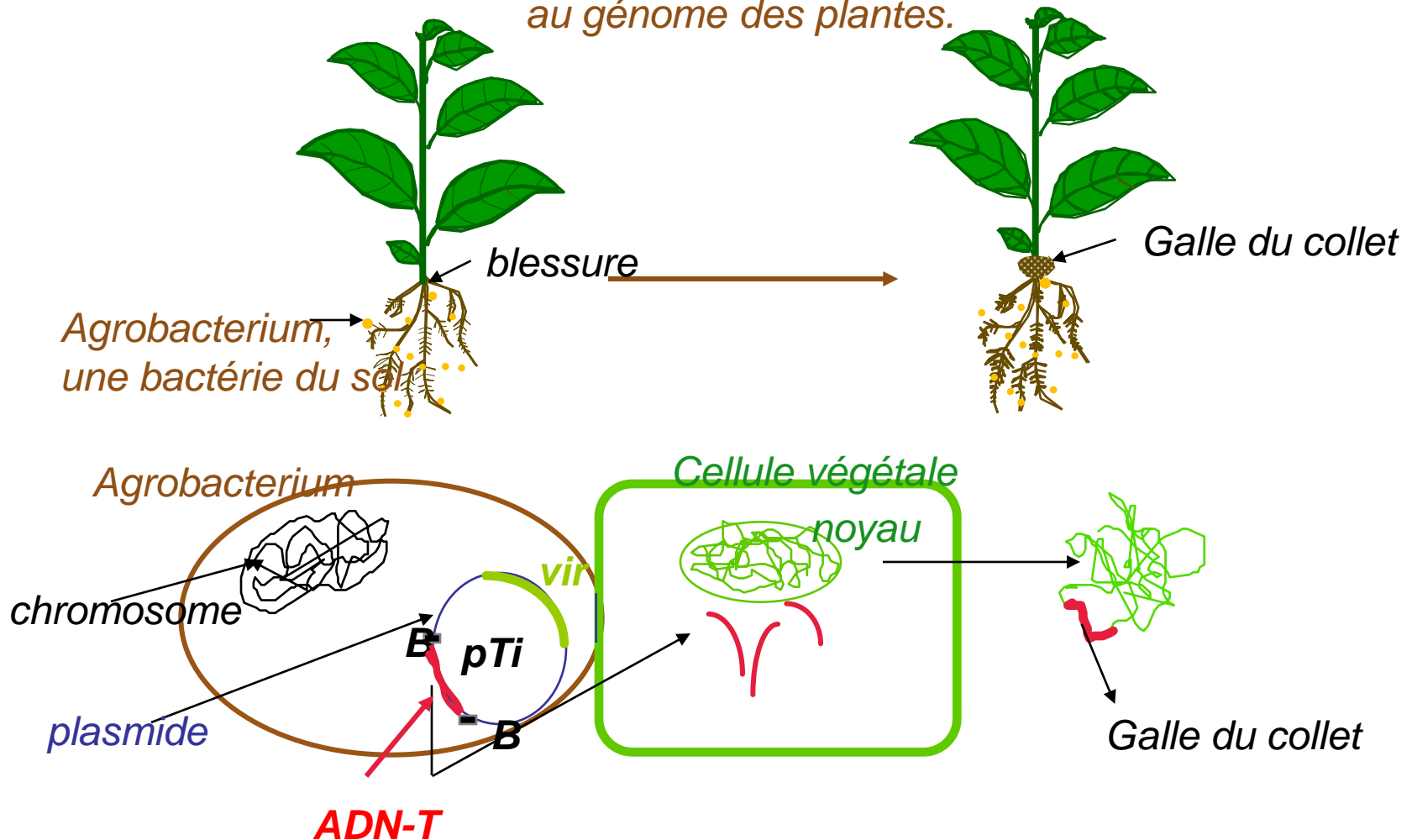
Des étapes à surmonter

1. Faire pénétrer l'ADN dans la cellule végétale : les méthodes de transfert
2. Exprimer le gène nouvellement introduit : les constructions
3. Trier les tissus transformés : le problème des gènes marqueurs
4. Obtenir une plante transgénique exprimant le gène introduit : la régénération à partir de la (des) cellule(s) transformées

Les méthodes de transfert de gènes

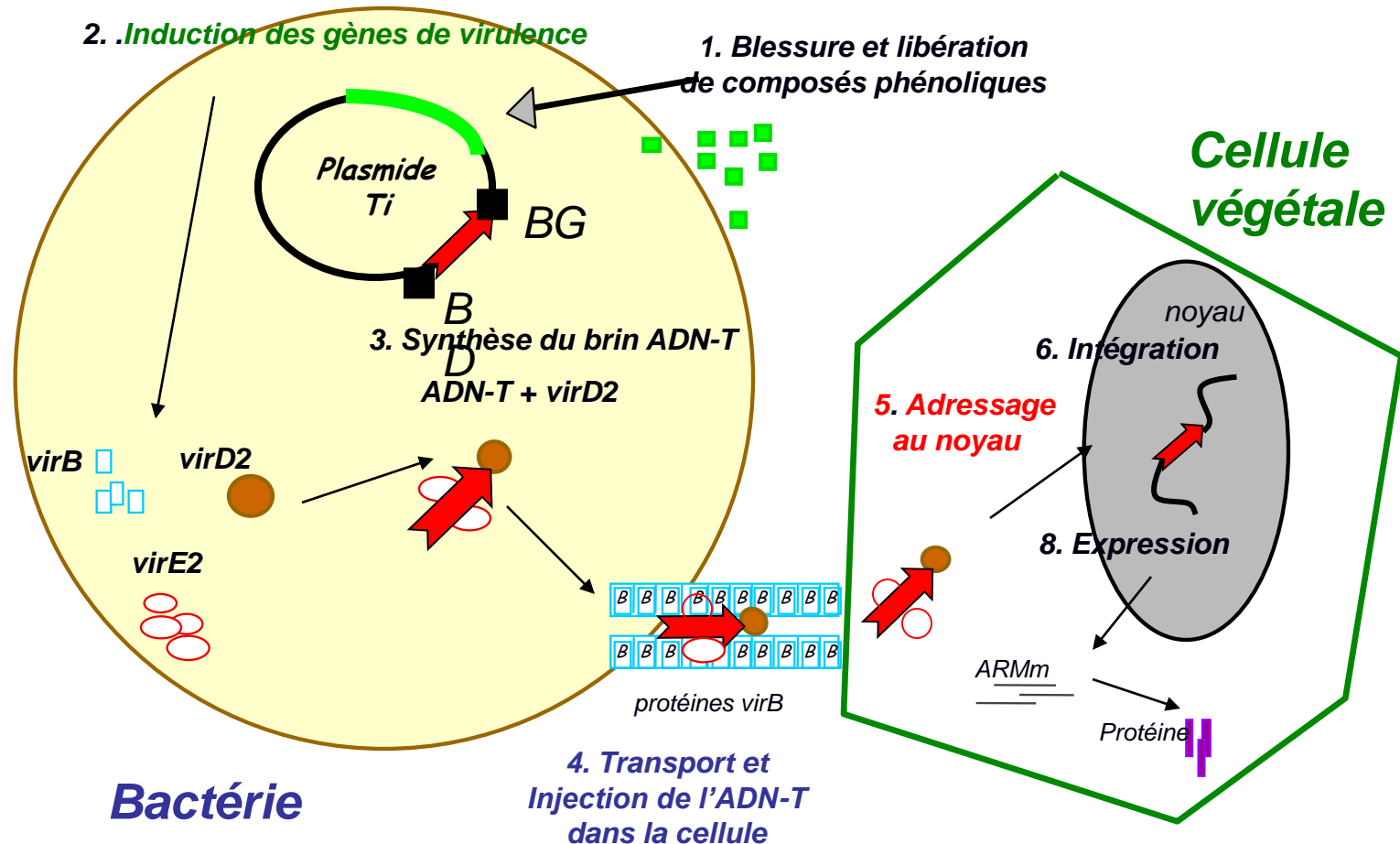
Agrobacterium tumefaciens : une bactérie qui fait du génie génétique

On utilise la propriété de la bactérie de transférer de l'ADN au génome des plantes.



Les méthodes de transfert de gènes

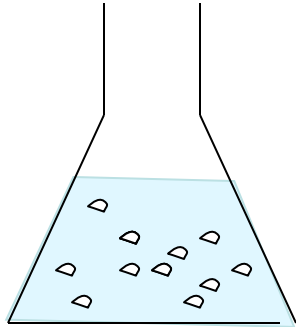
Agrobacterium tumefaciens transfère un fragment **d'ADN précis délimité** par deux séquences bordures de 25bp (BD et BG) dans le noyau de la cellule végétale



Les méthodes de transfert de gènes

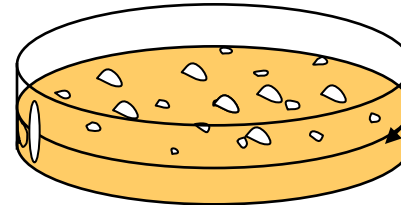
Agrobacterium tumefaciens

Le procédé



Inoculation :

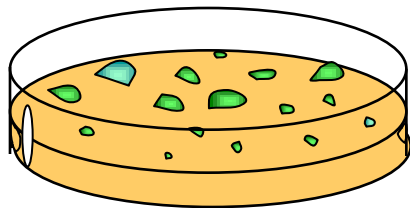
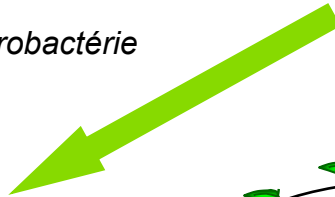
Explants dans suspension d'Agrobactérie



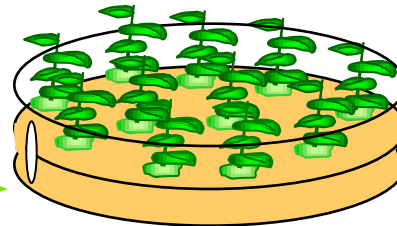
*Milieu de culture
pour prolifération
des cellules
végétales*

Coculture :

*Développement conjoint des cellules
végétales et de la bactérie*

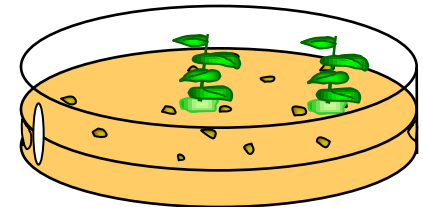


*Milieu de culture
+ antibiotique pour éliminer
la bactérie*



Différenciation de bourgeons

*Sans sélection des
cellules transformées*



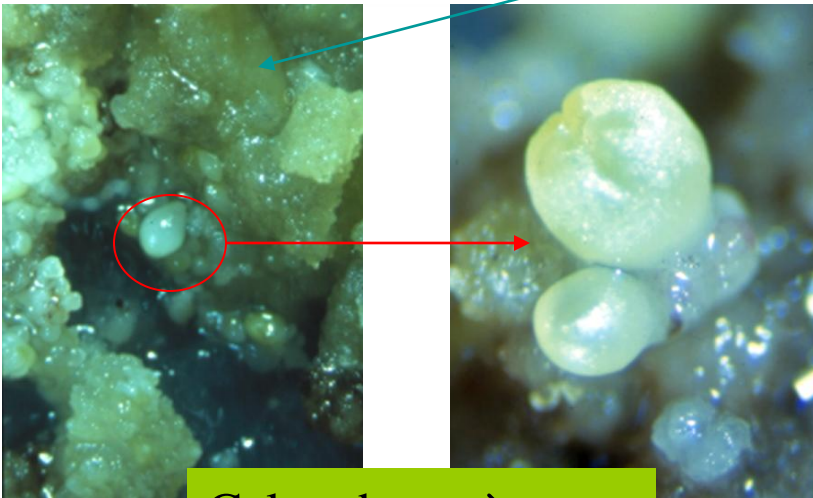
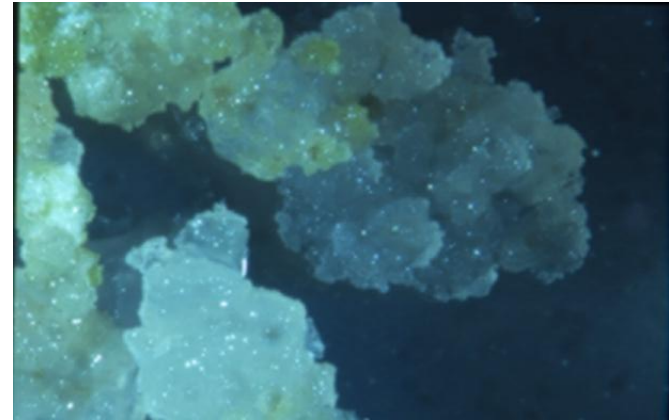
*Avec sélection des
cellules transformées*

Exemple du cotonnier

De l'explant aux embryons somatiques

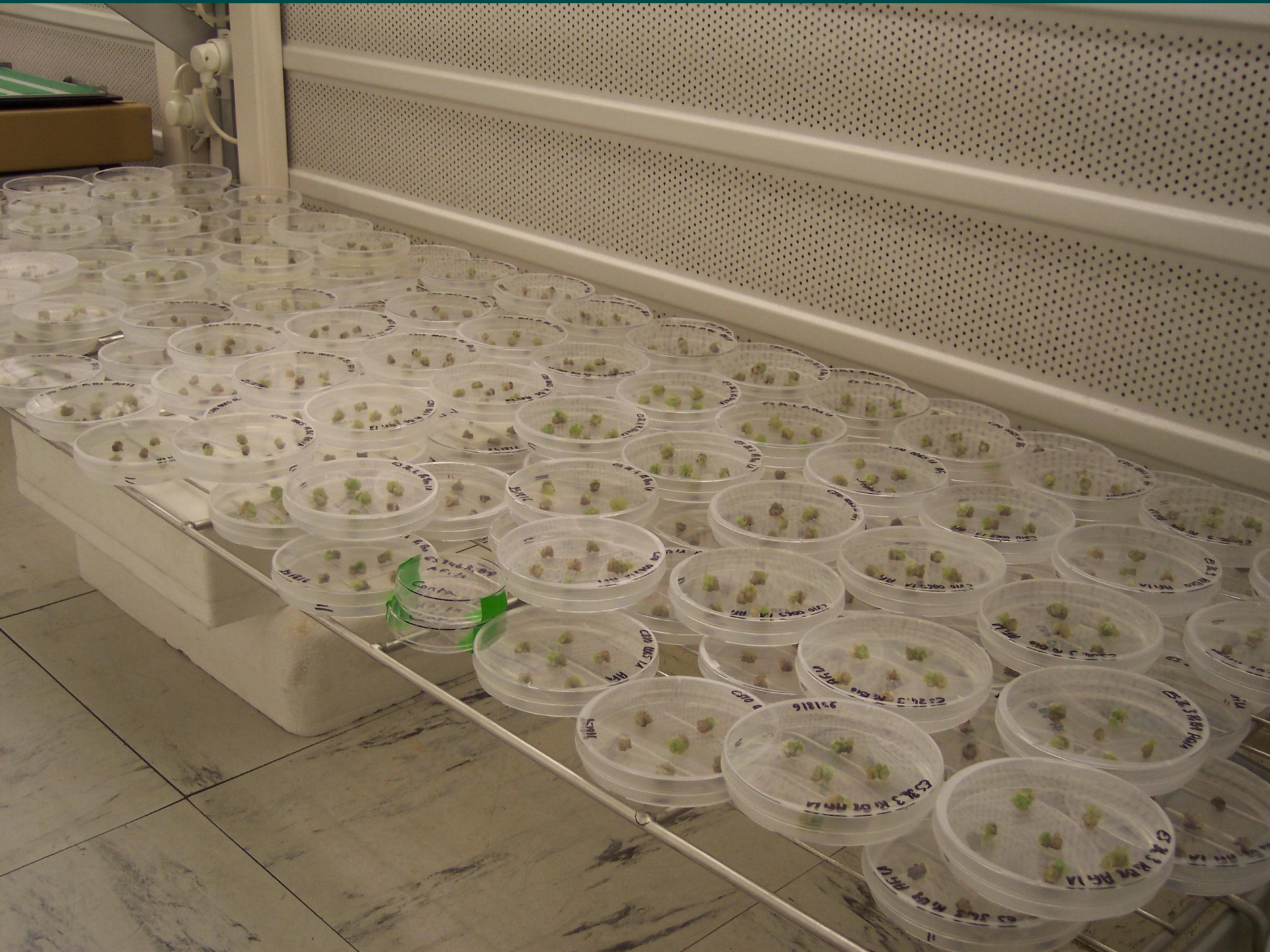


Fragment d'hypocotyle avec cal
(transformé) indifférencié



Cal embryogène





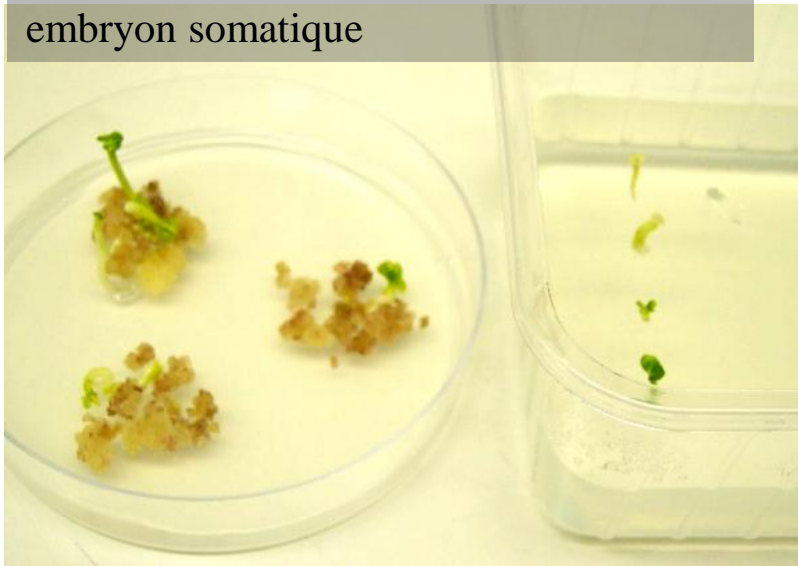


Exemple du cotonnier

De l'embryon au vitro-plant



Plant provenant du développement d'un embryon somatique



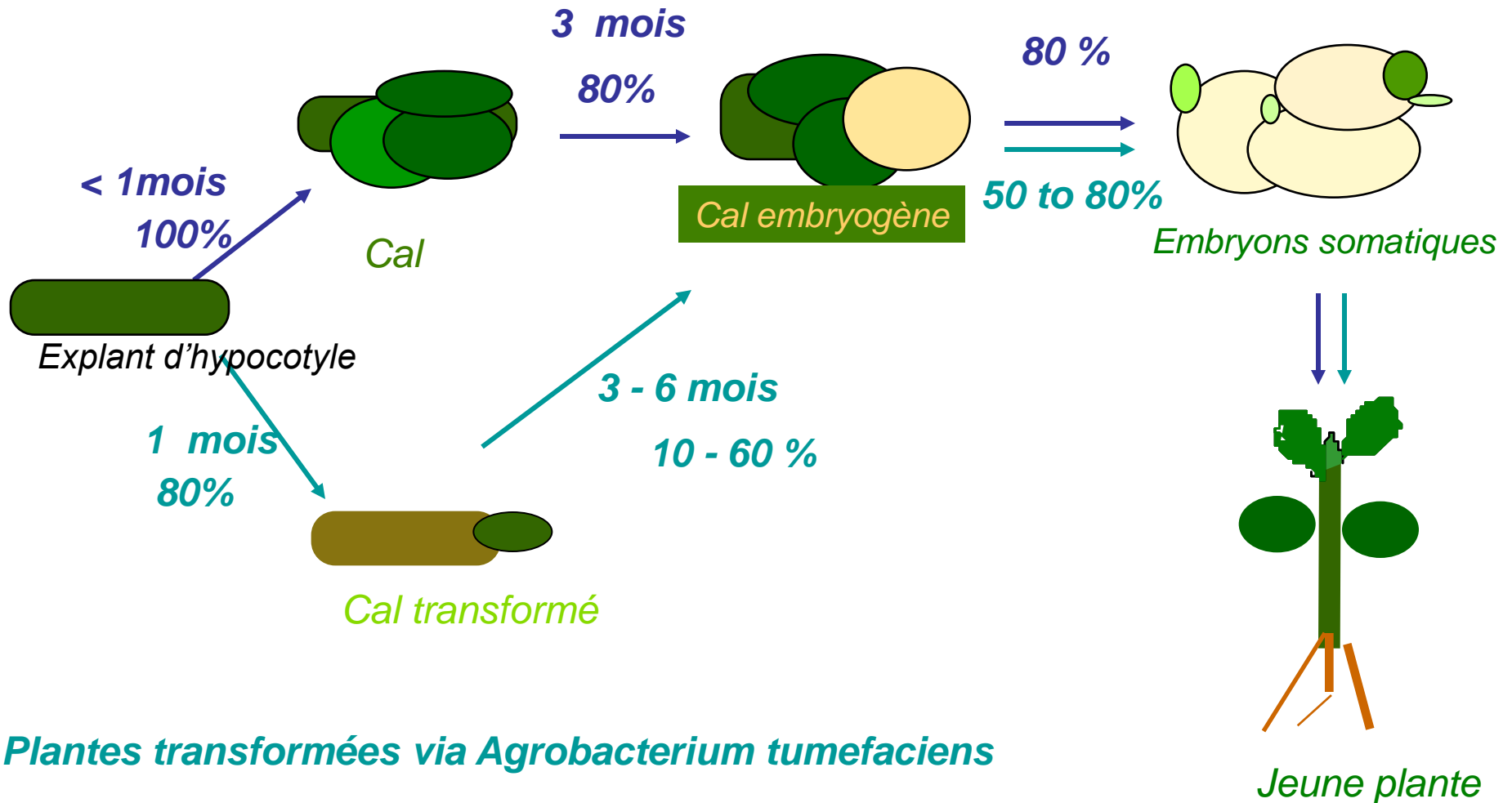
Exemple du cotonnier

Du vitro-plant à la graine



Limitations de la méthode

Régénération par embryogenèse somatique



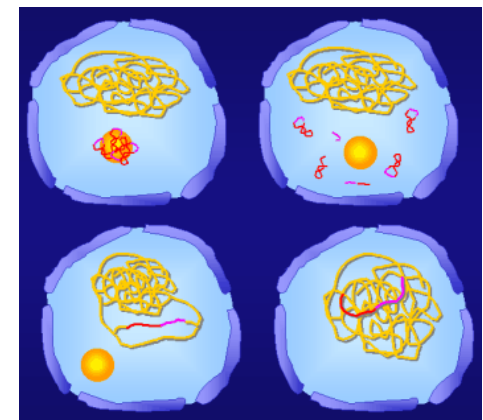
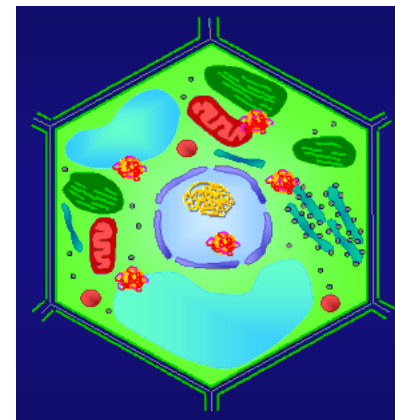
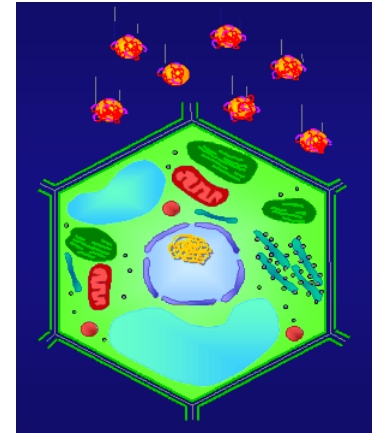
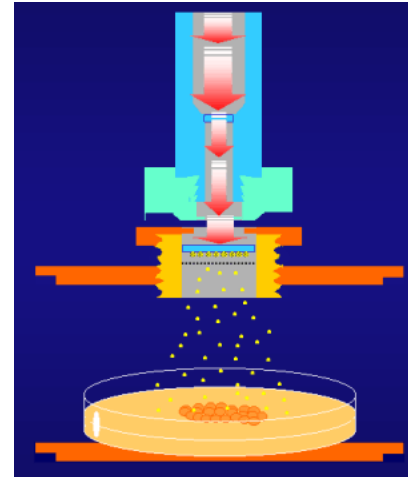
Plantes transformées via *Agrobacterium tumefaciens*

Biolistique :
Injection par
bombardement de
particules



Des moyens physiques

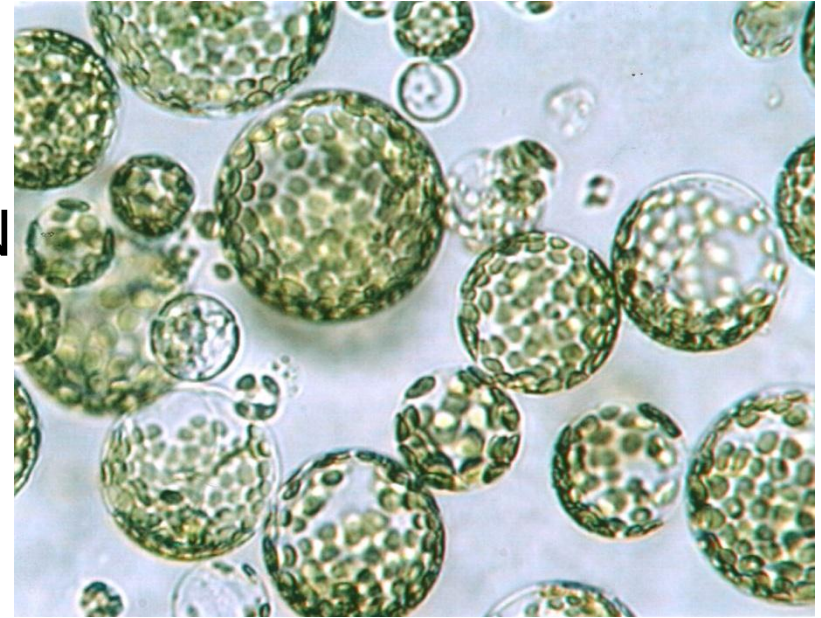
- forcer la pénétration de l'ADN à travers la paroi pectocellulosique des cellules végétales
- Envoi à très haute vitesse de billes d'or ou de tungstène enrobées d'ADN (canon à poudre ou à hélium)
- Possibilités de bombarder des organes: apex, embryons (pb chimères)
- Pas d'intégration d'un fragment bien délimité d'ADN
- Souvent très nombreuses copies du gène
- Délicate à mettre au point mais existe chez coton, soja, céréales...



Source F Casse - JC Breitler

Des moyens physiques

- Electroporation : Choc électrique pour transfert ADN dans des protoplastes



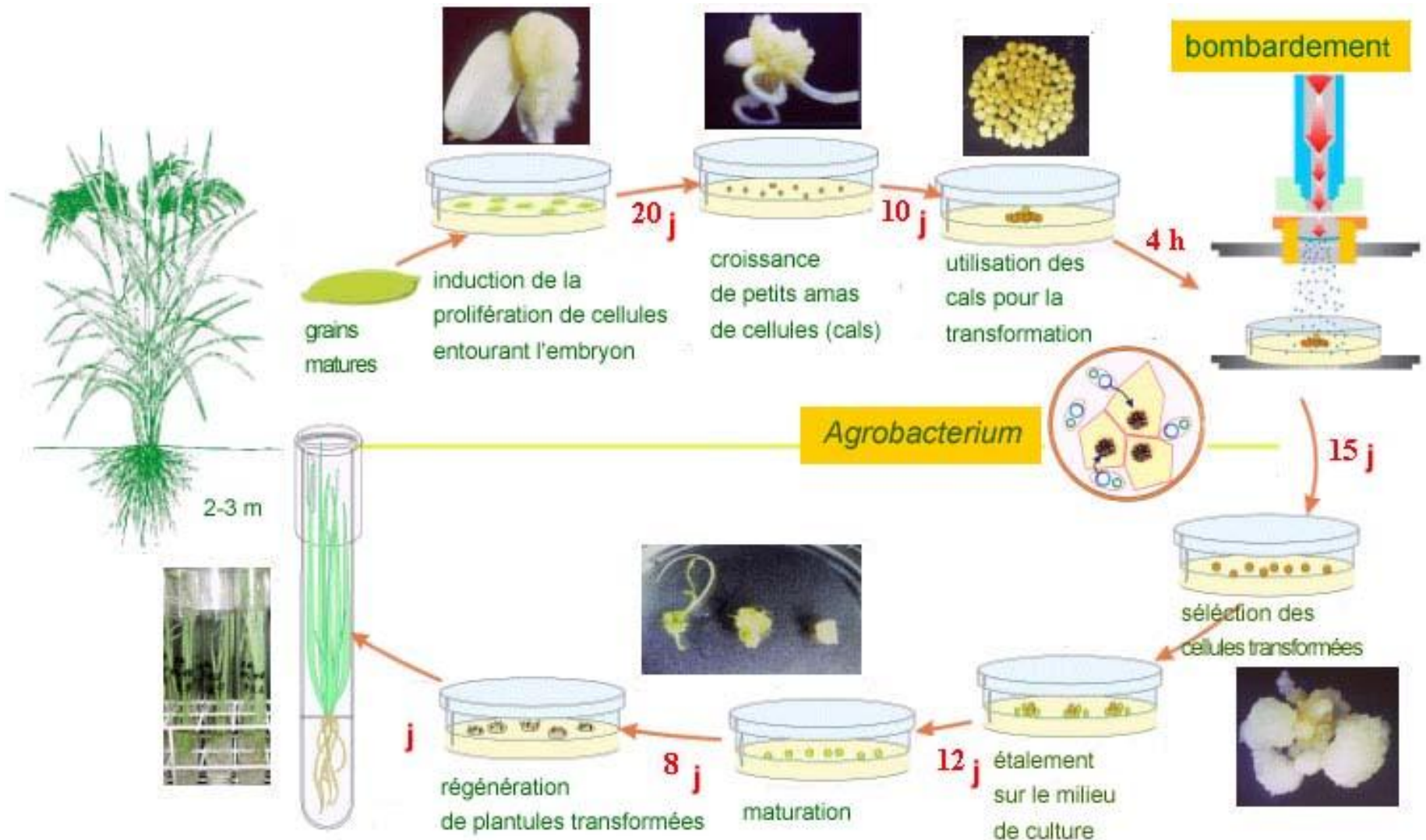
- Injection d'ADN dans les fleurs (cotonnier)





1 10:01 AM

Exemple du riz



Gènes candidats pour la résistance aux insectes

- Les gènes de la bactérie *Bacillus thuringiensis*
 - Protéines CRY (pendant la phase de sporulation):
 - lépidoptères
 - coléoptères
 - Protéines Vip (phase végétative)
- Gènes d'inhibiteurs de protéases (origine plantes)
 - Bloquent les protéases digestives de l'insecte (problème contournement)
- Gènes de chitinases (origine insectes)
 - Action sur la mue
- Gène d'avidine de blanc d'oeuf
 - forte affinité pour la biotine
- Gènes de cholestérol oxydase
 - Toxicité sur *Anthonomus grandis*
 - Exprimé *in planta* - Problème d'interférence sur le développement de la plante
- Gènes de lectines
 - Action sur les sucres - *in planta* un certain effet sur les homoptères

